

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

**Detección de la presencia del virus de Necrosis
Hematopoyética Epizoótica (EHNV) en truchas arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*) criadas en piscigranjas de
sistemas semi-intensivos de la sierra del Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Karen Elízabet BAUTISTA DEL RÍO

ASESOR

Alberto MANCHENGO SAYÁN

Lima - Perú

2015

Dedicado a mis padres, Lucía y Carlos, a mi hermano
Juan Carlos y a los maravillosos amigos que han
participado en mi desarrollo profesional.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
INTRODUCCION	1
REVISION DE LA LITERATURA	2
1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA.....	2
1.1.1 Acuicultura a Nivel Mundial.....	2
1.1.2 Acuicultura en el Perú.....	4
1.2 LA TRUCHA ARCOIRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	6
1.2.1 Clasificación taxonómica.....	6
1.2.2 Origen	6
1.2.3 Características biológicas de la trucha arcoíris	6
1.2.4 Producción de la trucha arcoíris en el país.....	7
1.3 FAMILIA IRIDOVIRIDAE	8
1.4 VIRUS DE NECROSIS HEMATOPOYETICA EPIZOOTICA.....	8
1.4.1 Características morfológicas	8
1.4.2 Replicación viral	9
1.5 ASPECTOS RELACIONADOS A LA PATOGENESIS POR EHNv.....	11
1.6 RESPUESTA INMUNE	14
1.7 EPIDEMIOLOGIA DE EHNv.....	15
1.7.1 Distribución Geográfica.....	15
1.7.2 Patrones de Transmisión	15
1.7.3 Factores Ambientales	16
1.8 SIGNOS CLINICOS.....	17
1.9 LESIONES MACROSCOPICAS	18
1.10 LESIONES MICROSCOPICAS.....	18
1.11 DIAGNOSTICOS DE EHNv.....	18
1.11.1 Diagnóstico basado en Signos Clínicos	18
1.11.2 Diagnóstico basado en Microscopía	19
1.11.3 Diagnóstico por Detección Antigénica	19
1.11.4 Pruebas serológicas	20
1.11.5 Pruebas moleculares.....	20
1.11.6 Diagnóstico diferencial de EHNv	21
1.12 PREVENCION Y CONTROL DE EHNv	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.13 LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO	23
1.14 DETERMINACION DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	23
1.15 METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....	24
1.15.1 Toma de muestras	25
1.15.2 Distribución de las muestras	25
1.15.3 Procesamiento de las muestras.....	25
1.15.4 Extracción de ADN.....	26
1.15.5 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
1.16 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN	31

CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35
APÉNDICE 1.....	40
APÉNDICE 2.....	42
APÉNDICE 3.....	44

RESUMEN

El Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNv) pertenece al Género Ranavirus de la Familia Iridoviridae que se caracterizan por su alta virulencia en truchas. El objetivo del presente trabajo fue la detección del EHNv en truchas de piscigranjas de las regiones de Áncash, Junín y Huancavelica. Se muestrearon 111 peces enfermos con sintomatologías del proceso viral, tomando la estimación del tamaño muestral en función de la prevalencia a detectar y el tamaño del lote de la OIE estimando una prevalencia del 5%. Se tomaron muestras de hígado, bazo y riñón anterior, los cuales fueron conservados a -196°C. Las muestras de cada tejido fueron procesadas para la extracción del ADN viral, el cual sirvió de molde para realizar el PCR utilizando los cebadores MCP-1 en la metodología propuesta por la OIE y con el kit comercial “Vet PCR TM EHNv Detection Kit”. No se detectó el ADN viral en las muestras trabajadas, indicando que la prevalencia del virus es menor al 5% o no está presente en las piscigranjas muestreadas. Si bien no se encontró la presencia del agente en las piscigranjas estudiadas, esta investigación ha significado el inicio de investigaciones que buscan establecer las epidemiologías de los agentes virales reportables a nivel internacional y que afectan el comercio internacional de los peces y sus productos.

Palabras clave: Trucha arcoíris; virus necrosis hematopoyética epizoótica; PCR; aislamiento bacteriano.

ABSTRACT

The Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) is a member of the genus Ranavirus in the family Iridoviridae, which is characterized by its high virulence in trouts. The aim of this study was the detection of the EHNV in trouts of fish hatcheries of the regions of Áncash, Junín and Huancavelica. One hundred and eleven (111) samples were taken from sick fishes showing the symptomatology of the viral process, taking the estimation of the sample size in function of the prevalence about to detect and the OIE lot size, estimating then a prevalence of 5%. Samples were taken from liver, spleen and front kidney; the organs were preserved at -196 °C. The samples of each tissue were processed for the extraction of viral DNA, which was employed as mold to run the PCR using the primers MCP-1 in the methodology proposed by the OIE and with the commercial kit “Vet PCR TM EHNv Detection Kit”. The viral DNA was not detected in the worked samples, indicating that the virus prevalence is less than 5% or it is not present in the fish hatcheries tested. Although the agent was not found in the fish hatcheries examined, this investigation may mark the beginning of others, which look for determine the epidemiology of reportable viral agents at international level and affect the worldwide commerce of fishes and its products.

Key words: rainbow trout; epizootic hematopoietic necrosis virus; PCR; bacterial isolation

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de acuicultura durante el 2013, solo peces para consumo FAO (2015).....	3
Cuadro 2. Principales países de exportación de productos de la acuicultura nacional durante el 2013 (PRODUCE, 2013).	5
Cuadro 3. Principales departamentos de extracción de truchas arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) en el Perú (PRODUCE, 2013).....	7
Cuadro 4. Escenario de la trucha arcoíris a nivel mundial (al 2010). PRODUCE (2011).....	8
Cuadro 5. Ensayos de PCR para el diagnóstico de EHNv y cebadores utilizados (Tomado de OIE 2012).	21
Cuadro 6. Estimación del tamaño muestral en función de la prevalencia a detector y el tamaño del lote (OIE, 2012)	23
Cuadro 7. Muestras obtenidas para el ensayo de PCR.....	24
Cuadro 8. Resultados de EHNv a partir de los ensayos de PCR.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de infección in vitro con Iridovirus y efecto sobre la producción de IL1 e IL6. Imagen obtenida de Siwicki <i>et al.</i> , 2001.....	13
Figura 2. Mortalidad masiva de <i>Perca fluviatilis</i> por EHNv. Se observa el tamaño de los peces afectados (juveniles), algunos de ellos presentan el abdomen hinchado (Imagen tomada de AGDA, 2014).....	17
Figura 3, 4 y 5. Resultados del primer, Segundo y tercer ensayo de PCR para la amplificación de la secuencia MCP de EHNv y otras especies de la familia Iridoviridae en peces (OIE, 2014).	30
Figura 6. Resultados del ensayo con VetPCRTM EHNv Detection Kit (Bioingetech, Chile).....	35

INTRODUCCION

La acuicultura en el Perú está en proceso de continuo crecimiento, similar a la tendencia mundial, siendo los peces quienes más aporte proteico están otorgando a la población humana a nivel mundial en la actualidad, superando a las aves, cerdos y vacunos. El Perú cuenta con ambientes favorables para el cultivo de peces en las aguas continentales y marinas, por lo que se espera que continúe el crecimiento. Esto conduce a la crianza de los peces a una mayor densidad poblacional en las piscifactorías y una mayor exigencia en el animal para aumentar su eficiencia en los índices productivos, haciendo susceptibles a los peces a infecciones de microorganismos patógenos, potenciando la posibilidad de epizootias a causa de los microorganismos patógenos presentes.

La importancia de la sanidad acuícola es cada vez mayor en las empresas del rubro, además de la exigencia del comercio internacional para el traslado de productos inocuos y de calidad. Como medida que evite el ingreso de enfermedades exóticas a una región o país, la OIE ha determinado la promulgación de la lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos, en los cuales los agentes patógenos de mayor peligro a nivel internacional deben ser monitoreados y declarados por los organismos oficiales, en muestreos continuos, en apoyo de esta actividad, ciertamente encontramos a este virus la lista.

El presente estudio tiene por objetivo la determinación de la presencia del virus de Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNV) en alevinos de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de sistemas semi-intensivos de la sierra del Perú, para iniciar los estudios de la epidemiología de los agentes virales que afectan a la trucha en nuestro territorio.

REVISION DE LA LITERATURA

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

1.1.1 Acuicultura a Nivel Mundial

Durante los últimos años la acuicultura ha alcanzado un gran crecimiento comercial a nivel mundial, debido al incremento en la tecnificación de los sistemas de cultivo así como a la introducción de nuevas especies en la crianza. De acuerdo a la FAO, durante los últimos 30 años la acuicultura ha mostrado un incremento en la tasa anual de 8.3%, dentro de los cuales el sector destinado a la alimentación humana es el que ha presentado mayor desempeño (PRODUCE, 2011). La contribución de la acuicultura a la producción pesquera mundial total alcanzó el 43,1 por ciento frente al 42,1 por ciento en 2012. Mientras tanto, la producción mundial de plantas acuáticas, principalmente algas, todavía está abrumadoramente dominado por la acuicultura (95.5 por ciento en 2013). (FAO, 2015)

La producción de acuicultura fue 70,2 millones de toneladas en 2013, un aumento del 5,6 por ciento desde 66,5 millones de toneladas en 2012. La producción de 27 millones de toneladas de plantas acuáticas cultivadas fue un 13,4 por ciento mayor a los 23,8 millones de toneladas de 2012. (FAO, 2015).

La producción acuícola solo de peces para consumo ha estado dominada por los países asiáticos, entre los cuales se encuentra China (43.55 millones de TM), India (4.55 millones de TM) e Indonesia (3.82 millones de TM), mientras que a nivel de Sudamérica encontramos a Chile (1.03 mil TM). De acuerdo a la FAO existe además un incremento en el consumo de peces per cápita de 8 a 8.5 kg para el año 2009. (PRODUCE, 2011) (Información detallada en el cuadro 1)

Cuadro 1. Principales países productores de acuicultura durante el 2013, solo peces para consumo FAO (2015).

NRO	PAIS	VOLUMEN (TM)	PARTICIPACIÓN MUNDIAL (%)
1	China	43'549'738	62.0
2	India	4'549'607	6.5
3	Indonesia	3'819'732	5.4
4	Vietnam	3'207'200	4.6
5	Bangladesh	1'859'808	2.6
6	Noruega	1'247'865	1.8
7	Egipto	1'097'544	1.6
8	Tailandia	1'056'944	1.5
9	Chile	1'033'206	1.5
10	Birmania	929'180	1.3
-	RESTO DEL MUNDO	7'839'023	11.2
TOTAL		70'189'848	100.0

Sin lugar a dudas, el incremento en la comercialización de especies marinas se debe a la apertura de nuevos mercados a nivel mundial y a la inserción de nuevas especies en la crianza comercial (tanto marina como continental) de igual modo, los aspectos de la globalización y los acuerdos comerciales vienen jugando un papel importante en la integración y dinamismo de los mercados y en el requerimiento de productos con mayor valor agregado, inocuos y de alta calidad. Por otro lado, uno de los aspectos de vital importancia en la comercialización de productos acuícolas es el fortalecimiento de las medidas de bioseguridad e inocuidad de alimentos en todos sus niveles, así como los aspectos relacionados al respeto ambiental y la inocuidad de productos (PRODUCE, 2011). Entre las principales especies acuáticas producidas a nivel mundial destacan la crianza de carpas, tilapias, langostinos, salmónidos, bagres, vieiras y algas (PRODUCE, 2011).

1.1.2 Acuicultura en el Perú

En relación a la Acuicultura nacional, para el año 2013 la producción alcanzó más de 125'693 mil toneladas, 68% proveniente del ámbito marino y 32% proveniente del ámbito continental. Gran parte de este crecimiento productivo se debe a especies cultivadas como las conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), langostino o camarones peneidos (*Litopenaneus vannamei*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). La producción de tilapias y peces amazónicos también crecieron durante este período (PRODUCE, 2013). Los niveles de cosecha acuícola según su nivel de desarrollo están sustentados en empresas de menor escala a o de pequeña y mediana empresa y las asociaciones que desarrollan actividades de repoblamiento las cuales en conjunto tienen una participación de 63.14%, el nivel de acuicultura de mayor escala tiene una participación de 36.22% y la acuicultura de subsistencia o de recursos limitados tendrían una participación de apenas 0.64%.

Actualmente existen departamentos que vienen convirtiéndose en principales zonas de producción del país. Por ejemplo, Tumbes se caracteriza por la crianza de langostinos (*Litopenaneus vannamei*), Piura y Ancash por las conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), San Martín y Piura por la crianza de tilapias (*Oreochromis spp.*) y Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno se caracterizan por la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (PRODUCE, 2011).

1.1.2.1 Comercialización de los productos acuícolas nacionales

En cuanto a la comercialización se debe señalar que la acuicultura cuenta con dos canales como son el mercado interno y el de exportación. En el mercado interno se debe indicar que las principales especies comercializadas son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la tilapia (*Oreochromis spp.*), la gamitana (*Colossoma macropomun*), el sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*), el langostino (*Litopenaneus vannamei*) y la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). De igual modo se debe mencionar que la evolución del mercado interno ha ido en aumento de manera geométrica. Mientras que las exportaciones de especies de la acuicultura peruana establecidos en los mercados internacionales son la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), langostino (*Litopenaneus*

vannamei), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis spp.*); asimismo, se viene abriendo mercado de exportación para el paiche (*Arapaima gigas*) y el cual se viene promocionando con el nombre comercial “arapaima” para los mercados internacionales. (PRODUCE, 2011) (Ver Cuadro 2.)

Cuadro 2. Principales países de exportación de productos de la acuicultura nacional durante el 2013 (PRODUCE, 2013).

ESPECIE	TMB Totales	PRINCIPALES PAIS
Concha de Abanico (<i>Argopecten purpuratus</i>)	17'399	Estados Unidos (6'686 TMB) Francia (5'793 TMB) Bélgica (1'435 TMB)
Langostino (<i>Litopenaneus vannamei</i>)	16'536	Estados Unidos (10'974 TMB) España (2'959 TMB) Francia (754 TMB)
Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1'518	Canadá (431 TMB) Alemania (183 TMB) Suecia (66 TMB)
Tilapia (<i>Oreochromis spp.</i>)	286	Estados Unidos (228 TMB) Ecuador (56 TMB)
Paiche (<i>Arapaima gigas</i>)	118	Estados Unidos (113 TMB) Otros (5 TMB)

1.2 LA TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

1.2.1 Clasificación taxonómica

La siguiente clasificación se basa en la información obtenida de Smith (1989).

- Reino: Animalia
- Phylum: Cordata
- Clase: Actinopterygii
- Orden: Salmoniformes
- Familia: Salmonidae
- Género: *Oncorhynchus*
- Especie: *Oncorhynchus mykiss*
- Nombre común: Trucha arcoíris

1.2.2 Origen

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es oriunda de Norteamérica, desde los territorios de Alaska hasta México y habitan en las desembocaduras de los ríos hacia el Océano Pacífico. La especie ha sido introducida a casi todos los continentes con la excepción de la Antártida. Actualmente la crianza de truchas arcoíris se practica en cuencas continentales tropicales y subtropicales de países de Asia, Sudamérica y Este de África (FAO, 2009).

1.2.3 Características biológicas de la trucha arcoíris

Los especímenes en general presentan desove una vez al año. Las hembras presentan una capacidad de desove de hasta 20000/kg de peso. No obstante, los sistemas de crianza selectiva han logrado desarrollar cepas con maduración más temprana y desove continuo, así como mayor resistencia a enfermedades e incremento de parámetros productivos (FAO, 2009). En los sistemas de crianza tecnificados las truchas no desovan, por lo que las larvas son obtenidas mediante desove artificial. Se han observado diferencias en las crianzas de truchas de río y truchas de lago, siendo las truchas de río

de coloración más oscura e intensa, mientras que las truchas de lago son más brillantes y plateadas (FAO, 2009).

1.2.4 Producción de la trucha arcoíris en el país

La trucha arcoíris fue introducida al Perú en el año 1928 y es una especie que se ha adaptado bien a las condiciones climáticas de aguas frías, especialmente en la región andina del país (Ver Cuadro 3.) . Los sistemas de producción a nivel nacional han ido prosperando debido a la disponibilidad de agua de buena calidad, aunque problemas relacionados con desechos de minería y agricultura pueden ocasionar contaminación. Entre los problemas de mayor importancia a nivel nacional es la insuficiente producción local de semillas de calidad (de acuerdo a la necesidad de los productores), la contaminación de cuerpos de agua y la escasa infraestructura de las plantas de procesamiento (PRODUCE, 2011).

Cuadro 3. Principales departamentos de extracción de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Perú (PRODUCE, 2013).

TIPO DE UTILIZACIÓN	DEPARTAMENTO	TM Totales
Fresco	Puno	28'510
	Junín	1'747
	Cusco	882
Congelado	Huancavelica	766
	Puno	639

En relación al peso de cosecha de la trucha arcoíris frente a sus productos, éstos varían según el tipo de presentación. Por ejemplo, la trucha eviscerada se encuentra en 81.5%, el filete mariposa con cabeza corresponde el 74%, el filete con piel y espinas corresponde del 56 a 58%, filete sin piel y sin

espinas el 50% y la presentación de ahumado corresponde al 33% (PRODUCE, 2011). El cuadro 4 brinda una presentación de la trucha arcoíris a nivel mundial.

Cuadro 4. Escenario de la trucha arcoíris a nivel mundial (al 2010). PRODUCE (2011)

Volumen de cosecha al 2010	14'250 TM
Valor de exportación al 2010	5'928 millones de dólares
Principales destinos al 2010	Canadá, Noruega, Alemania, etc
Ranking mundial de la trucha arcoíris	Puesto Nro 12 (1ro Chile; 2do Noruega; 3ro Irán; etc
Ranking en América latina y el Caribe	Puesto Nro 3 (1ro Chile, 2do Estados Unidos; 4ro México

1.3 FAMILIA IRIDOVIRIDAE

La familia Iridoviridae actualmente se encuentra clasificada en cinco géneros (Iridovirus, Chloriridovirus, Ranavirus, Megalocytivirus, y Lymphocystivirus), los cuales a su vez presentan una o más especies, subespecies o variantes virales (Chinchar *et al.*, 2009). Específicamente, dentro del género Ranavirus existen seis especies virales (Ambystomun tigrinum virus, Bohle Iridovirus, Epizootic Hematopoietic Necrotic virus, European catfish virus, Frog Virus 3, Santee Cooper Ranavirus) (Crane y Hyatt, 2011).

1.4 VIRUS DE NECROSIS HEMATOPOYETICA EPIZOOTICA

1.4.1 Características morfológicas

Los virus pertenecientes a la familia Iridoviridae se caracterizan por presentar un tamaño relativamente grande (120-200 nm de diámetro), ser virus de tipo icosaédricos y en algunos casos presentar una membrana lipídica interna entre el core viral y la nucleocápside (Chinchar *et al.*, 2009). Los miembros de la familia se caracterizan por presentar una cadena lineal doble de ADN, cuyo tamaño varía entre los 140 kpb (Ranavirus) a más de 200 kpb (Iridovirus) (Chinchar *et al.*, 2009). El genoma viral de los virus de la familia consiste de aproximadamente 105'903 pares de bases que codifican para 97 marcos de lectura abierta (*ORFs*) (Eaton *et al.* 2007). Además, la presencia de

envoltura puede estar presente en algunos virus luego de salir de las células infectadas, pero no es necesaria para la infección (Maclachlan & Dubovi 2010). La familia Iridoviridae es segregada en dos grupos mayores a partir de sus niveles de metilación genómica, debido a la presencia de una metiltransferasa presente en Iridovirus de peces que facilita la metilación de hasta 20% de residuos de citosina en el ADN genómico, similar a lo observado en el ADN bacteriano (Maclachlan y Dubovi 2010).

1.4.2 Replicación viral

Una de las características de mayor importancia de EHNv así como de los miembros de la familia Iridoviridae es su capacidad de replicación tanto a nivel del núcleo como del citoplasma (OIE, 2012). A continuación, se describen cada uno de los pasos durante el proceso de replicación viral:

1.4.2.1 Ingreso viral a las células hospedadoras

Las características más importantes de la replicación viral de EHNv derivan de los estudios realizados en el virus Rana -3 (*Frog Virus 3*), el virus tipo del género Ranavirus. Los virus de esta familia ingresan a la célula blanco mediante unión a sus receptores en un proceso de endocitosis ph-dependiente con formación de clatrin (virus con envoltura), ingresan directamente o ingresan mediante fusión con la membrana plasmática (virus desnudos) (Chinchar *et al.*, 2011).

1.4.2.2 Primera fase de replicación a nivel del núcleo celular

Sin importar las rutas de ingreso del virus a la célula, el proceso continúa con el ingreso del material genético viral al núcleo. A diferencia de los Herpesvirus, el genoma viral de los Iridovirus no es infeccioso, lo cual indica que proteínas asociadas al virión son requeridas para iniciar la transcripción viral. Los transcritos tempranos (inmediatos y retrasados) son sintetizados por trans-activadores transcripcionales putativos asociados al virión y codificados por el virus (Chinchar *et al.*, 2011).

Entre los productos de la transcripción temprana está la ADN polimerasa viral que cataliza la síntesis de copias de unidades de ADN viral de tamaños unitarios (*unit-sized* DNA) dentro del núcleo. Asimismo, algunas proteínas tempranas inmediatas y retrasadas incluyen componentes que cumplen un rol en bloquear la respuesta inmune como por ejemplo la proteína CARD (Caspase activation and recruitment domain) proteínas v CARD (motif-containing proteins), beta-hidroxiesteroideos deshidrogenasas (β HSD) y proteínas con actividad ARNasa III, proteínas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos (PCNAs), ADN metiltransferasas (DMTasa), subunidades grandes y pequeñas del homólogo viral de la ARN polimerasa II (vPol II α y II β), factores de transcripción, proteínas catalíticas, subunidades de ribodinucleótido reductasas y proteínas no esenciales para replicación *in vitro* (Chinchar *et al.*, 2011).

1.4.2.3 Segunda fase de replicación a nivel del citoplasma celular

Durante la segunda fase de replicación viral, las nuevas cadenas de ADN sintetizadas son transportadas y recombinadas en una gran estructura concatamérica, equivalente en tamaño a más de 10 genomas. Estos concatémeros sirven para la producción final del ADN maduro de los virus (Goorha, 1982). Desde un punto de vista filogenético, el ejemplo detallado de la replicación del Ranavirus-3 indicaría que los Ranavirus son una forma intermedia en la evolución entre virus ADN nuclear y citoplasmáticos. La metilación de la cadena de ADN ha sido reportada en los virus pertenecientes al género Ranavirus (Chinchar *et al.*, 2011). Este proceso es desarrollado por una ADN metiltransferasa del virión y ocurre en el citoplasma (Willis & Granoff 1980). Se especula que el mecanismo de metilación de la cadena de ADN previene la formación de muescas en la cadena de ADN por endonucleasas codificadas por el virión, aunque otras posibles funciones de este proceso existen, por ejemplo se ha propuesto que la metilación de la cadena de ADN puede prevenir la inducción de respuesta inmune innata mediado por TLR-9 en el hospedador (Williams *et al.*, 2005).

1.4.2.4 Síntesis de proteínas y ensamblaje del virión

Posterior a la producción de moléculas concatenarias de ADN y la síntesis de proteínas estructurales y no estructurales por el virión se produce el ensamblaje viral. Aunque no se conoce con detalle el proceso preciso de morfogénesis viral, a partir de estudios comparativos con el virus de Fiebre Porcina Africana y otros Iridovirus parece ser que la síntesis de una membrana (tal vez proveniente del Retículo Endoplásmico) sirve como cimientto para la unión de proteínas y de la cápside, dándole una formación icosaédrica al virus (Holopainen, 2012). Finalmente, el ADN viral es empaquetado mediante mecanismos que resultarán en la generación de genomas circularmente permutados y terminalmente redundantes (Holopainen, 2012). El virus finalmente sale al extracelular con la membrana de la célula infectada o se acumula dentro del citoplasma formando gran cantidad de compuestos paracristalinos (Chinchar *et al.*, 2011).

1.5 ASPECTOS RELACIONADOS A LA PATOGENESIS POR EHNv

Diversos estudios histopatológicos han sido llevados a cabo durante brotes de la enfermedad en percas y truchas arcoíris. Dichos estudios demostraron infecciones intercurrentes durante los brotes, demostrando además una variedad de lesiones y signos clínicos. (Reddacliff y Whittington, 1996). Las truchas clínicamente afectadas presentan una coloración oscura, manifiestan ataxia y están deprimidas; a la observación macroscópica el bazo y los riñones se presentan inflamados y puede observarse algunos focos de palidez en el hígado (Reddacliff y Whittington 1996). Hasta ahora no se ha podido demostrar si EHNv puede ser detectado en tejidos gonadales, lo que indicaría posibles rutas de transmisión sexual y posiblemente transmisión vertical (OIE, 2012).

A nivel microscópico se pueden apreciar focos de necrosis en el tejido hematopoyético renal, congestión, edema a nivel de la vejiga natatoria y focos de miocarditis necrótica aguda. A nivel de los hepatocitos es posible encontrar inclusiones intracitoplasmáticas basofílicas alrededor de los focos necróticos, así como también en las células intersticiales renales y en el bazo (Reddacliff y Whittington 1996).

Las altas tasas de mortalidad, los bajos niveles de infección en truchas arcoiris hacen pensar que la tasa de portadores probablemente sea baja (<2%) (Whittington *et al.*, 1994). Los estudios experimentales han demostrado solamente bajos niveles de infección persistente con una baja carga viral activa (Whittington & Reddacliff 1995). No obstante, se ha demostrado que la presencia de factores ambientales y de estrés desencadenan la aparición de brotes de la enfermedad en peces de cultivo (Whittington y Reddacliff, 1995).

La principal característica de las lesiones observadas en infecciones por EHNv es la presencia de necrosis en el tejido hematopoyético renal (Siwicki *et al.*, 2001). Los estudios microscópicos demuestran la presencia de macrófagos y neutrófilos a nivel del tejido intersticial, los cuales albergan partículas virales en sus fagosomas (Siwicki *et al.*, 2001). Los estudios experimentales demuestran que los virus de la familia Iridoviridae disminuyen la actividad fagocítica al disminuir el PKA (Potential Killing Activity) de los macrófagos. Asimismo, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* la producción de proteínas con actividad IL-1 e IL-6 en células infectadas con Iridovirus pero no en células no infectadas (Siwicki *et al.*, 2001). Estos resultados demostrarían una influencia directa de los Iridovirus de peces sobre la inmunocompetencia celular y un efecto supresor sobre la actividad fagocítica, aunque existirían diferencias en la susceptibilidad entre especies (ver figura 1).

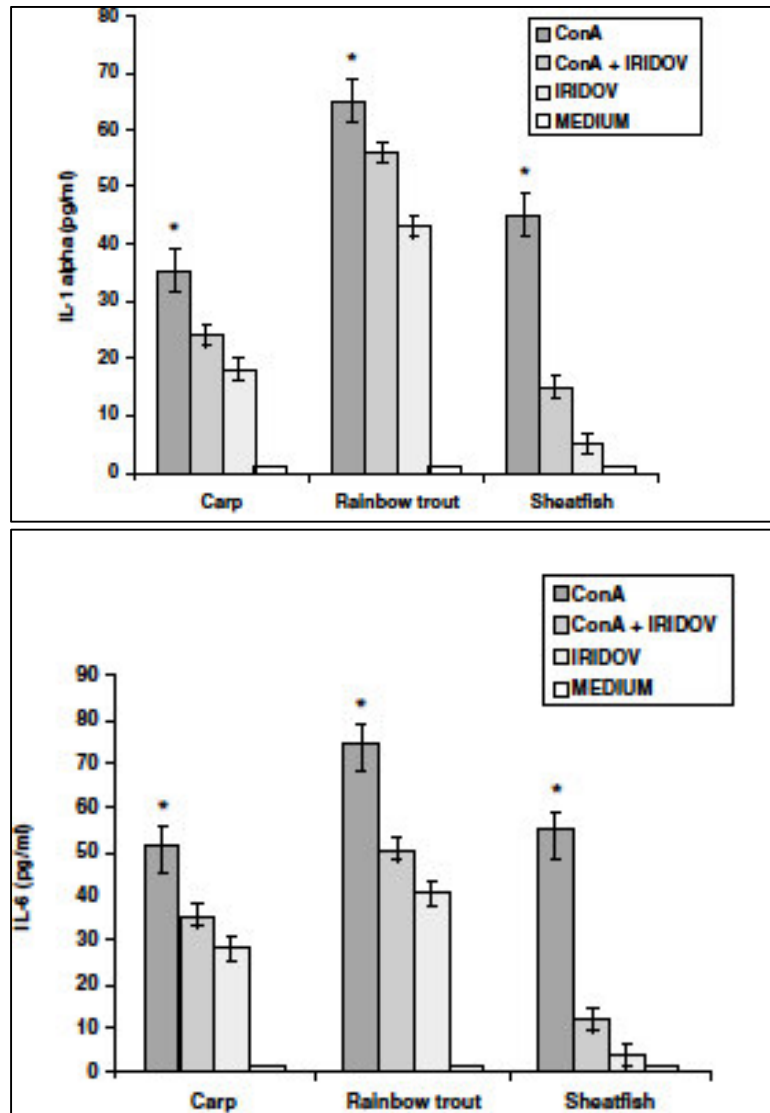


Figura 1. Resultados de infección *in vitro* con Iridovirus y efecto sobre la producción de IL1 e IL6. Imagen obtenida de Siwicki *et al.*, 2001.

Uno de los efectos de mayor importancia mediados por varios Ranavirus es su capacidad citopática *in vitro* (Williams *et al.*, 2005). Se ha sugerido un rol de las caspasas en la activación de los procesos apoptóticos en células infectadas. Sin embargo, aún no queda claro si la muerte celular observada en animales infectados corresponde a cuadros necróticos o apoptóticos (Williams *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha descrito en el Ranavirus modelo FV-3 un efecto inhibitorio de la síntesis de macromoléculas en las células infectadas (Goorha *et al.*, 1979), debido posiblemente al detenimiento de los procesos de transcripción y traducción como efectos directos del virus. Este fenómeno es

acompañado por una síntesis selectiva de las proteínas virales (Williams *et al.*, 2005). La transición hacia un incremento en la síntesis de proteínas virales es el resultado de varios eventos de interacción: inhibición de la transcripción celular, degradación de los mensajes celulares, síntesis de gran cantidad de transcritos virales y la presencia de factores de iniciación virales homólogos al de las células eucariontes como el eIF-2alfa, el cual cumple la función de mantener la traducción viral (Chinchar & Dholakia, 1989; Chinchar & Yu, 1990).

1.6 RESPUESTA INMUNE

La comprensión del desarrollo de la respuesta inmune hacia los Ranavirus ha sido obtenida a partir de los estudios en la especie *Xenopus*, los cuales permiten una extrapolación a los sucesos en vertebrados mayores. En especies de vertebrados menores se ha demostrado el efecto de respuesta inmune innata, con la producción de componentes antimicrobianos, proteínas del complemento y la producción de células NK (Hogan *et al.* 1999; Chinchar & Wang, 2001). Asimismo, se ha demostrado en anfibios y peces el desarrollo de anticuerpos contra los virus (Bengtén *et al.* 2000) y células con actividad citotóxica antígeno-específica (Yoder, 2004). Los análisis de secuenciamiento han demostrado la presencia de citoquinas con actividad antiviral como TNF, interferón y otros componentes inmunorelacionados como los receptores Fas y la caspasa 8 (Long *et al.*, 2004). No obstante, existen algunas diferencias en relación a vertebrados menores y mayores en relación a los patrones de expresión de MHCI y las respuesta citotóxicas de células T (Du Pasquier *et al.*, 1989).

Se ha demostrado en peces con infecciones necróticas en bazo tejido hematopoyético renal una supresión de la actividad fagocítica y la proliferación linfocitaria *in vitro* (Siwicki *et al.* 1999) aunque no se han reportado los mismos resultados *in vivo*. Asimismo, la presencia mundial de infecciones subclínicas con Iridovirus sugieren que tanto la respuesta inmune innata como la adquirida controlan la virulencia de la infección y previenen la enfermedad clínica (Hanson *et al.* 2001).

1.7 EPIDEMIOLOGIA DE EHNv

Actualmente existen controversias en relación con las características epidemiológicas relacionadas a la epizootia por EHNv. De ellas, al menos tres posibilidades han sido discutidas actualmente: 1). Comercio de peces de cultivo; 2). Comercio de peces ornamentales y 3). Anfibios y reptiles como posibles reservorios asociado además a las condiciones ambientales. A la fecha, el origen de EHNv permanece incierto, pues únicamente ha sido aislado a partir de los peces teleósteos *P. fluviatilis* y *O. mykiss*, no obstante estudios de infección experimental demostrarían que otras especies de peces podrían ser potencialmente susceptibles a EHNv (Becker *et al.*, 2013).

1.7.1 Distribución Geográfica

La infección por EHNv ha sido reconocida desde sus inicios en Australia donde fue reportada por primera vez en percas (*Perca fluviatilis*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en brotes de enfermedad que se caracterizaron por la presencia de focos necróticos en los tejidos hematopoyéticos de riñones, hígado y bazo, con altas tasas de mortalidad en peces juveniles. Actualmente la enfermedad es considerada endémica en el sureste Australiano, aunque la enfermedad se caracteriza por su presentación no constante, como ha sido demostrado por Whittington *et al.*, (1999) quienes demostró en brotes de EHNv en truchas arcoíris que la enfermedad tiene un bajo nivel infectivo pero altamente virulenta.

1.7.2 Patrones de Transmisión

En general, los patrones de infección observados en Ranavirus en hospedadores vertebrados ectodérmicos explican el éxito en la persistencia del virus en el medio ambiente (Reddacliff & Whittington, 1996). Los resultados de estudios experimentales en el virus FV3 (virus modelo de Ranavirus) indican transmisión acuática entre varias clases de hospedadores vertebrados, lo cual no había sido demostrado anteriormente. Con relación a EHNv, los patrones de transmisión han sido reconocidos con detalle en las dos únicas especies reconocidas de ser afectadas por el virus (trucha

arcoíris y perca dorada). En las truchas arcoíris, los mecanismos de transmisión se han asociado a la transferencia de alevines infectados o mediante el transporte de aguas entre piscigranjas (Langdon *et al.*, 1988; Whittington *et al.* 1994).

Sin lugar a dudas, los bajos niveles de prevalencia de la enfermedad y el hecho de que peces adultos son generalmente asintomáticos favorecen la dispersión de EHNv entre centros de producción. Los estudios de monitoreo de EHNv han demostrado que el virus puede estar presente en peces de todas las edades, por lo general no se encuentra asociado con la presencia de signos clínicos y solamente una pequeña proporción de peces post-infección suelen ser positivos a anticuerpos específicos. (Whittington *et al.* 1994). Estudios epidemiológicos de EHNv y su introducción en Inglaterra y Gales indicarían que las posibles rutas de ingreso del virus se deberían al ingreso de peces no susceptibles que en realidad podrían portar el virus, lo cual no se había considerado anteriormente en la epidemiología de EHNv (Peeler *et al.* 2009).

1.7.3 Factores Ambientales

Sin lugar a duda, debido a los patrones de infección de Ranavirus en vertebrados ectodérmicos, los factores ambientales ejercen alteración en los mecanismos de interacción Ranavirus-hospedadores (Whittington & Reddacliff, 1995). La habilidad de los Iridovirus para sobrevivir fuera de las células hospedadoras aún es motivo de controversia, no obstante su estabilidad en el agua ha sido atribuida a la membrana lipídica interna que poseen (Kelly, 1985). Bajo condiciones de laboratorio se ha demostrado que los virus son sensibles a la desecación, mientras que la exposición solar a luz ultravioleta lleva a una rápida inactivación del virus en el agua (Williams *et al.*, 2005).

Factores bióticos (dependientes del virus) así como factores abióticos como la temperatura del agua, estadíos de desarrollo de hospedadores, densidad, competición de recursos ejercen efecto sobre la prevalencia y virulencia de EHNv (Lesbarreres *et al.*, 2012). Se han reportado brotes de la enfermedad en truchas arcoíris en aguas con rangos de temperatura de 11 a 20 °C (Whittington *et*

al.,1994); de forma experimental (luego de inoculación intraperitoneal) los períodos de incubación varían de 3 a 10 días a 19 a 20 °C a 14 a 32 días con 8 a 10 °C (OIE, 2012). Por otro lado, los brotes de infección natural en percas adultas y juveniles han ocurrido principalmente en los meses de verano (Langdon *et al.*, 1988).

1.8 SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos asociados a EHNv por lo general no son específicos y únicamente son notorios en animales juveniles. Durante un brote de la enfermedad típicamente cientos o incluso miles de truchas juveniles (<10 cm) son encontradas muertas en un cuerpo de agua (Ver figura 2). Los peces infectados pierden apetito y peces <25 centímetros presentan un nado errático y desorientado. Peces adultos pueden verse además afectado cuando EHNv llega por primera vez a una población susceptible (AGDA, 2014).



Figura 2. Mortalidad masiva de *Perca fluviatilis* por EHNv. Se observa el tamaño de los peces afectados (juveniles), algunos de ellos presentan el abdomen hinchado (Imagen tomada de AGDA, 2014).

1.9 LESIONES MACROSCOPICAS

Las lesiones macroscópicas comúnmente encontradas corresponden a la presencia de abdomen hinchado, un cambio en la coloración de la piel (tono más oscuro), focos hemorrágicos en la base de las aletas, muerte repentina de especímenes, incremento del tamaño de los riñones, hígado y bazo (AGDA, 2014). En algunos casos es posible además encontrar focos de lesión blanquecinas o amarillentas en el parénquima hepático (AGDA, 2014).

1.10 LESIONES MICROSCOPICAS

Los hallazgos microscópicos encontrados en especímenes hallados muertos corresponden a necrosis licuefactiva en el tejido hematopoyético renal, bazo e hígado. En algunos casos es posible además ver cuadros necróticos en el corazón, páncreas, tracto gastrointestinal y branquias (AGDA, 2014). Estudios patológicos durante brotes de la enfermedad en truchas arcoíris y percas indican la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas basofílicas en los hepatocitos alrededor de los focos necróticos y en algunos casos en las células del intersticio de los riñones y bazo. En las percas infectadas es posible observar cuadros de trombosis y exudado fibrinoso en las branquias así como necrosis focal de la lámina propia del intestino (Reddacliff y Whittington, 1996).

1.11 DIAGNOSTICOS DE EHNv

1.11.1 Diagnóstico basado en Signos Clínicos

El diagnóstico basado en los signos clínicos resulta de muy poca ayuda, dado que los signos clínicos son inespecíficos. Es común encontrar especímenes juveniles muertos, algunos con el abdomen hinchado o lesiones oscuras en la piel y opérculos (Reddacliff y Whittington 1996), así como cambios en la conducta (pérdida de equilibrio durante el nado) (OIE, 2012). Algunos factores relacionados a EHNv son las malas prácticas de crianza (el sobre poblamiento de peces y la mala

calidad del agua, los cuales se manifiestan cambios en la piel y branquias de los peces (Reddacliff y Whittington, 1996).

1.11.2 Diagnóstico basado en Microscopía

Mediante la microscopía convencional (tinciones de hematoxilina y eosina) es posible observar múltiples focos de necrosis de tipo coagulativa o licuefactiva. Usualmente es posible observar inclusiones intracitoplasmáticas basofílicas, particularmente alrededor de los focos de necrosis en el hígado y los riñones. En algunas ocasiones las lesiones se extienden al corazón, páncreas, tracto gastrointestinal y branquias (Reddacliff y Whittington, 1996). La microscopía aplicada es útil para la descripción de tejido celular que exhibe necrosis. Dentro del citoplasma se observan los agregados, correspondientes a virus icosaédricos no envueltos. Por lo general los núcleos de las células infectadas se ubican a la periferia y presentan una morfología distorsionada (OIE, 2012).

1.11.3 Diagnóstico por Detección Antigénica

La detección antigénica de EHNv es una prueba de gran ayuda para la detección e identificación de la enfermedad. No obstante, debemos considerar que el uso de anticuerpos policlonales podría dar como resultado la reacción cruzada con todos los Ranavirus conocidos (a excepción del Ranavirus Santé Cooper) (Cinkova *et al.*, 2010; Ahne *et al.*, 1998; Hendrick *et al.*, 1992).

1.11.3.1 Prueba de ELISA de captura de antígeno

La prueba de ELISA de captura de antígeno ha sido validada para la detección de EHNv a partir de cultivos celulares e incluso a partir de homogenizados de tejidos. El uso de anticuerpos anti-EHNv de conejo ha sido desarrollado para su uso en formatos de ELISA, inmunoperoxidasa e inmuno electro microscopía (Reddacliff y Whittington, 1996). Ya que no se pueden realizar pruebas de neutralización viral (debido a la no producción de anticuerpos neutralizantes post inmunización de peces, pues estos

están principalmente dirigidos contra a proteína mayor de la cápside) el uso del ELISA como una prueba screening es una alternativa diagnóstica (OIE, 2012).

1.11.3.2 Prueba de Inmunoperoxidasa

Esta prueba se basa en la unión por afinidad de anticuerpos purificados a las proteínas virales. El virus EHNv es detectado mediante anticuerpos anti-especie biotinilados y conjugado de peroxidasa-estreptavidina (OIE 2012). La adición de sustrato resulta en una tinción roja en las áreas de las células unidas con los anticuerpos marcados (OIE, 2012).

1.11.3.3 Prueba de Inmunohistoquímica

Este método permite la detección de antígenos de EHNv a partir de secciones de tejidos fijados en formalina (Reddacliff y Whittington 1996). La prueba utiliza peroxidasa-estreptavidina e inmunoglobulinas biotiniladas utilizadas para el marcaje (OIE, 2012). Una muestra resulta positiva al observarse zonas de color pardo alrededor del tejido degenerado y áreas necróticas en el parénquima.

1.11.4 Pruebas serológicas

Hasta la fecha no se han podido detectar anticuerpos neutralizantes contra EHNv en peces o mamíferos infectados. A pesar de ello, se han desarrollado algunas pruebas de detección de anticuerpos luego de la exposición con EHNv tanto en truchas arcoiris como en percas (Whittington y Reddacliff 1995; Whittington *et al.* 1994). A pesar de ello, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas no es del todo conocido y la interpretación de los resultados resulta complicada.

1.11.5 Pruebas moleculares

La identificación molecular de EHNv se basa en pruebas como PCR y PCR en tiempo real, no obstante, ninguna de ambas pruebas ha sido validada para el diagnóstico primario de EHNv por la OIE. A pesar de ello, la identificación de Ranavirus a nivel de género y especie es posible mediante el

uso de varias estrategias de PCR (OIE, 2012). Entre ellas, tenemos por ejemplo la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con enzimas de restricción, en la cual luego de la amplificación de los productos de ADN, con el uso de los cebadores para la región MCP-1, se realizará la digestión mediante el uso de enzimas PflM lo que permite la diferenciación de Iridovirus Australianos (EHNv y BIV) de Iridovirus no Australianos (FV3 y ECV). Asimismo, productos de amplificación mediante el cebador para la secuencia MCP-2 pueden ser digeridos con las enzimas Hinc II, Acc I y Fnu4H I (de forma individual) lo que permite la diferenciación de virus Australianos (EHNv y BIV) de virus Americanos (FV3) y Europeos (ECV) (OIE, 2012). El cuadro 5 describe los cebadores usados comúnmente para el diagnóstico de EHNv.

Cuadro 5. Ensayos de PCR para el diagnóstico de EHNv y cebadores utilizados (Tomado de OIE 2012).

Ensayo de PCR	Cebador	Secuencia	Tamaño de productos	Localización de genes
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 pb	266 - 586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 pb	842 - 1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

1.11.6 Diagnóstico diferencial de EHNv

El diagnóstico diferencial de EHNv puede incluir enfermedades como la forunculosis, la Necrosis Hematopoyética Infecciosa, Septicemia Viral Hemorrágica. Estas se deben básicamente a las lesiones macroscópicas observadas así como a la manifestación clínica en los peces (AGDA, 2014) .

1.12 PREVENCIÓN Y CONTROL DE EHNv

Dentro de Australia, EHNv presenta un rango geográfico limitado al sureste de la región (Australia del Sur, New South Wales y Victoria). Si bien la enfermedad es endémica en estos escenarios

únicamente es reportada de forma infrecuente. Los trabajos iniciales de Langdon (1988) demostraron que el virus de EHNv es extremadamente resistente a la resequedad, puede persistir por meses en el agua, además de persistir en carcasas congeladas y en tejidos en general hasta por un año (Crane y Hyatt 2011).

A la fecha no existen vacunas para el control de EHNv en las piscigranjas infectadas. Por lo tanto, las medidas de prevención radican principalmente en las prácticas de bioseguridad, programas de vigilancia sanitaria y buenas prácticas de crianza que tiendan a reducir los factores fisiológicos de estrés (Crane y Hyatt, 2011). Los resultados de los estudios epidemiológicos de EHNv indican que el virus puede encontrarse en truchas de todas las edades y no necesariamente se manifiesta clínicamente (Whittington *et al.*, 1999). Asimismo, la enfermedad puede ser transmitida durante el comercio de pescados. Por lo tanto, se ha propuesto que el muestreo y la detección de EHNv deberían estar basados en el examen rutinario de mortalidad y necropsia en lugar del muestreo aleatorio de peces vivos (Whittington *et al.*, 1999). En Australia (país considerado endémico a EHNv) se realizan certificaciones de aquellos centros piscícolas previo a la distribución de pescados y/o huevecillos, mientras que ante la presencia de un brote en un nuevo escenario, la erradicación de todos los peces infectados y en contacto con peces enfermos es recomendado (Plumb y Hanson 2011). Por otro lado, todos los equipos e instalaciones de crianza deben ser completamente desinfectados con hipoclorito de sodio (Na HCl 200 mg/L) luego de retirar toda la materia orgánica (Langdon, 1989).

Debido a que la principal vía de ingreso de EHNv es mediante la importación de productos infectados, se deben tener todas las medidas sanitarias durante la importación de productos (Peeler *et al.* 2009). EHNv no ha sido demostrado aún en los sistemas de producción piscícola del Perú; no obstante, la presencia de cuadros similares en varios centros de producción nos hace pensar en la posibilidad de que esta enfermedad esté presente en las crianzas de truchas arcoíris.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.13 LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO

El presente estudio fue realizado durante los meses de abril a junio del 2013. La fase de colección de especímenes fue realizada en tres piscigranjas semi-tecnificadas ubicadas en las provincias de Huancayo, Huaraz y Castrovirreyna departamentos de Junín, Ancash y Huancavelica respectivamente. La fase del análisis de laboratorio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, sección de Ictiopatología, así como en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección de Virología, ambas pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1.14 DETERMINACION DEL TAMAÑO MUESTRAL

La determinación del número de muestras mínimo para el presente estudio se basó en la información referencial publicada en el Manual de Pruebas Diagnósticas para Especies Acuáticas. (Ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Estimación del tamaño muestral en función de la prevalencia a detector y el tamaño del lote (OIE, 2012)

Tamaño del lote	Tamaño de la muestra para una prevalencia de 2%	Tamaño de la muestra para una prevalencia de 5%	Tamaño de la muestra para una prevalencia de 10%
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
1500	140	55	27
2000	145	60	27

4000	145	60	27
10000	145	60	27
100000 o más	150	60	30

A partir de esta información, para un nivel de prevalencia de 5% y un tamaño de lote de aproximadamente 2000 especímenes, se calculó un tamaño de muestra mínimo de 60 peces.

Finalmente, se recolectaron 111 especímenes. Las muestras fueron obtenidas como se describe a continuación (ver cuadro 7):

Cuadro 7. Muestras obtenidas para el ensayo de PCR

Procedencia	Número	Muestras
Huaraz	35	Bazo, riñón, hígado
Ingenio – Huancayo	40	Bazo, riñón, hígado
Castrovirreyna Huancavelica	36	Bazo, riñón, hígado
TOTAL	111	

- 35 muestras de alevines enfermos procedentes de Huaraz, departamento de Ancash.
- 40 muestras de alevines enfermos provenientes de granjas piscícolas de la provincia de Huancayo, departamento de Junín.
- 36 muestras de alevines enfermos provenientes de centros piscícolas de la provincia Castrovirreyna, departamento de Huancavelica.

1.15 METODOLOGÍA DE ESTUDIO

La Metodología del presente estudio corresponde a un diseño de tipo observacional, transversal y no asociativo. Este tipo de estudios involucran la colección de muestras de una población para una

característica especial, durante un período de tiempo específico con la finalidad de describir una característica común como la prevalencia y/o frecuencia de alguna enfermedad.

1.15.1 Toma de muestras

Para el estudio se realizó la captura de especímenes juveniles (alevines) con sintomatología clínica de enfermedad, en diferentes pozas de crianza de cada una de las piscigranjas evaluadas. Una vez capturados los especímenes, se procedió a baños de inmersión con hidrócloro de benzocaína (45mg/l de agua) para producir anestesia en los peces. Posteriormente los especímenes fueron eutanasiados mediante la técnica de corte medular (Roberts y Shepherd 1980). Los animales fueron medidos y pesados para posteriormente realizar la necropsia.

La necropsia de los peces fue realizada mediante la metodología establecida para especies de laboratorio (Ostrander, 2000). Se realizó el examen *in situ* de los órganos internos y posteriormente se realizó la toma de muestra de los siguientes tejidos: hígado, bazo, riñones. Las muestras fueron colocadas en bolsas herméticamente selladas y fueron transportadas en cadena de frío a las instalaciones de la FMV-UNMSM.

1.15.2 Distribución de las muestras

A partir de las muestras obtenidas de los especímenes colectados, se organizó un pool para cada una de ellas (bazo, riñón e hígado) las cuales son distribuidas de acuerdo con las piscigranjas evaluadas.

1.15.3 Procesamiento de las muestras

Se realizó el procesamiento de las muestras para la extracción de ADN en las instalaciones del laboratorio de Ictiopatología de la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Mediante el uso de tijeras se extrajeron 5 gramos de cada uno de los tejidos colectados, a partir de los cuales se realizaron las moliendas, utilizando pilón y morteros estériles. Finalmente se obtuvo un pool de

tejidos. A partir de las moliendas se alicuotaron en 500 µl de suero fisiológico estéril. Las muestras finalmente fueron colocadas en crioviales de 1 ml y almacenados en congelación (-70°C) para su posterior procesamiento.

1.15.4 Extracción de ADN

Se realizó la extracción del material genético (ADN) a partir de las muestras mediante el método de unión a membranas de sílica (PureLink Genomic DNA Kit). Este método está diseñado para la extracción eficiente de material genético proveniente de tejidos animales, sangre y bacterias. La descripción detallada de los pasos durante la extracción es presentada con detalle en el Anexo 1. Brevemente, el tejido es sometido a lisis celular mediante digestión con proteasa K a 55°C. Posteriormente el tejido lisado es mezclado con Etanol y Buffer de unión, que permiten que el ADN suelto quede unido a membranas de sílica en las columnas. Las impurezas fueron removidas mediante lavado con buffers específicos. Finalmente, las muestras obtenidas fueron almacenadas en una solución buffer bajo en sales y libre de nucleasas a -70°C para su posterior procesamiento mediante PCR.

1.15.5 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1.15.5.1 Preparación de Cebadores de MCP - 1

Se realizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para la amplificación de la secuencia MCP-1 de la familia Iridoviridae en peces (de 580 pb) (OIE, 2012). Para ello, se utilizaron los siguientes juegos de cebadores (*primers*): 1). Forward (5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3') y 2). Reverse (5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3'). Los primers han sido diseñados bajo la secuencia de datos del GenBank de la NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). La descripción detallada del protocolo del ensayo de PCR es presentado en el Anexo 2.

Brevemente, se procedió a la reconstitución de los cebadores para alcanzar una concentración de 10 μM a partir de 100 μM (debido a que están liofilizados). Para ello, utilizamos la siguiente expresión:

$$100 \mu\text{M} = 0.1 \text{ nM}$$

Reconstituimos para nuestros cebadores:

$$\text{MCP1-151: } 47.56 \text{ nM} / 0.1 = 475.6 \mu\text{L de H}_2\text{O}$$

$$\text{MCP1-152: } 41.117 \text{ nM} / 0.1 = 411.7 \mu\text{L de H}_2\text{O}$$

Finalmente se agregarán las cantidades calculadas de H₂O libres de nucleasas y los cebadores serán almacenados a -20°C. Cada muestra tuvo un volumen de 20 μl y estuvo conformada por 2 μl de muestra de ADN, 1 μl de cada cebador, 6 μl de H₂O libre de nucleótidos y 10 μl de Taq polimerasa. Por otro lado, la muestra control de especie corresponde a la secuencia para la molécula de beta – actina, para lo cual se utilizaron 10 μl de beta-actina, 10 μl de cada cebador, 6 μl de H₂O libre de nucleótidos y 10 μl de Taq polimerasa.

Los ciclos de la reacción son descritos a continuación:

- 1 ciclo inicial de desnaturalización del ADN a 94°C (2 minutos)
- 40 ciclos de:
 - Desnaturalización (40 segundos a 94°C)
 - Hibridización (30 segundos a 50°C)
 - Extensión (1 minuto a 72°C)
 - Extensión final (5 minutos a 72°C)

Posteriormente se incubaron las muestras a 14°C y se realizó la lectura de los resultados.

1.15.5.1.1 Lectura de productos mediante Electroforesis en geles de Agarosa

Luego de la amplificación de la secuencia MCP de EHNv mediante PCR, se procedió a la lectura de los productos o amplicones mediante electroforesis en geles de agarosa. Para cada uno de los crioviales se procedió a colocar 1.3 µl del bromuro de etidio. Se preparó además 2 µl de buffer de carga del marcador y 10 µl del marcador de peso molecular. Así mismo se utilizó como marcador de especie a la secuencia de amplificación de la beta-actina. Se prepararon geles de agarosa al 2% y en cada uno de los pocillos en los geles se colocaron 18 µl de la mezcla contenida en cada criovial.

La corrida electroforética fue a 80 V A:0.3/P3-4 por una hora. Posteriormente los geles fueron llevados a la campana de transiluminación para la lectura de los resultados (en función a las bandas obtenidas para la secuencia MP de EHNv).

1.15.5.2 Vet PCR TM EHNv Detection Kit

Se siguió las indicaciones del producto (Bioingetech, Chile). La descripción detallada del protocolo del ensayo de PCR es presentado en el Anexo 3, teniendo un amplificado de 187 pb en el control positivo y de 140pb del control interno.

1.16 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los resultados del análisis de PCR a partir de las muestras de tejidos fueron interpretados como positivos o negativos a EHNv (presencia/ausencia de bandas diagnósticas en la electroforesis correspondiente a MCP). La información sería organizada como frecuencia (animales positivos/animales muestreados) en una tabla resumen. Diferencias estadísticas entre las frecuencias de animales positivos y la procedencia (Huancayo/Huaraz) fueron analizadas mediante la prueba de Chi Cuadrado, en el programa estadístico Stata 12.0 (Stata Corp).

RESULTADOS

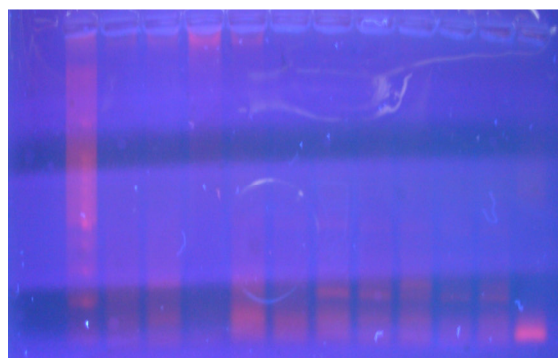
A la necropsia de los peces presentaron principalmente esplenomegalia y hemorragias en diversos órganos. El análisis bacteriológico determinó el aislamiento de agentes bacterianos como *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas spp.*

En el cuadro 8 se muestran los resultados de los ensayos de PCR para el diagnóstico de EHNv a partir de las muestras de tejido de truchas arcoiris. Se realizaron 3 ensayos de PCR según la procedencia de muestras. Los resultados no demostraron la presencia de material genético de EHNv a partir de las muestras.

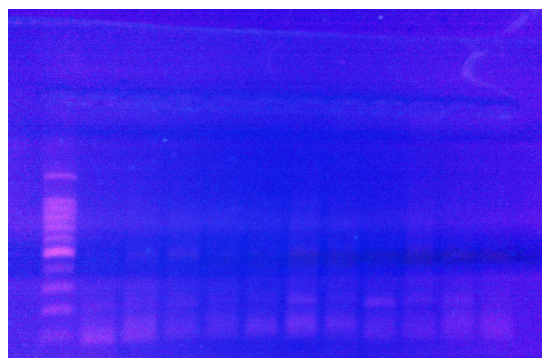
Cuadro 8. Resultados de EHNv a partir de los ensayos de PCR

Numero de Ensayo de PCR	Muestras procesadas por ensayo	Resultados de PCR
1	Huancayo Junín	Negativo (0/40)
2	Huaraz- Ancash	Negativo (0/35)
3	Castrovirreyna- Huancavelica	Negativo (0/36)
		NEGATIVO (0/111)

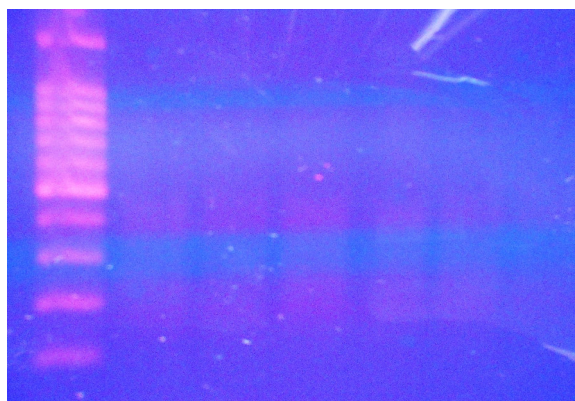
Las figuras 3, 4 y 5 indican las corridas de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa. Como indican las imágenes, no se evidencian bandas específicas indicativas de la amplificación de la secuencia MCP para Ranavirus con un tamaño de 321pb. Se observan algunos productos inespecíficos de menor tamaño en algunas muestras junto a las bandas de los cebadores no utilizados.



(4)



(5)



(6)

Figura 3, 4 y 5. Resultados del primer, Segundo y tercer ensayo de PCR para la amplificación de la secuencia MCP de EHNv y otras especies de la familia Iridoviridae en peces (OIE, 2014).

Para confirmar la negatividad de las muestras, se realizó la PCR con la prueba “VetPCRTM EHNv Detection kit”. Todas las muestras no amplificaron el segmento génico viral de 187pb como se observa en el control positivo (figura 6).

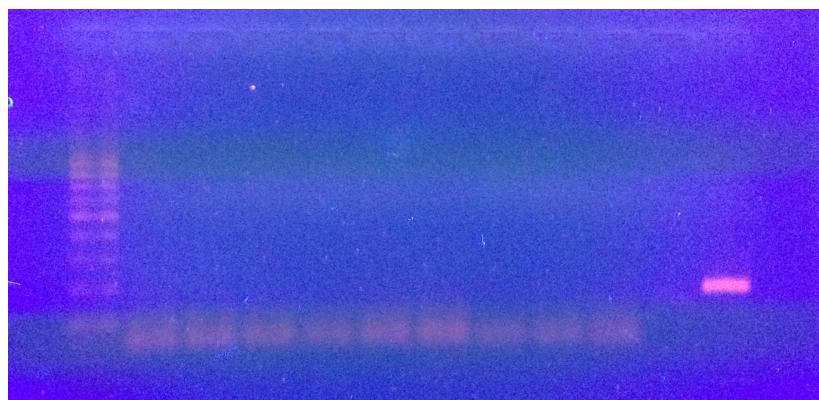


Figura 6. Resultados del ensayo con Vet PCR TM EHNv Detection Kit (Bioingetech, Chile).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo no se determinó la presencia del genoma del virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNv) en los 111 animales enfermos de tres piscigranjas. Similar resultado ha tenido un estudio epidemiológico del SENASA Argentina, en la zona comprendida por la cuenca alta del río Limay en Argentina en donde se trabajaron un total de mil doscientas cuarenta y nueve (1249) muestras por histopatología y ciento sesenta y dos (162) muestras por PCR durante el periodo 2002 al 2008. Durante los años posteriores (hasta 2013), se muestrearon un mínimo de ciento setenta (170) ejemplares por ambas técnicas, declarando libre de la enfermedad en el 2013 (SENASA Argentina, 2013).

El virus se ha reportado primero en Australia (Whittington *et al.*, 1999) y luego en los Estados Unidos de Norteamérica. En Sudamérica no existen datos viables en los reportes de la OIE (OIE, 2012), el presente estudio nos indica que no está presente el virus en las truchas o tiene una prevalencia inferior al 5%. Debido a que el virus en la trucha arco iris tiene un comportamiento distinto a otras especies susceptibles como la perca (Reddacliff y Whittington, 1996), es necesario tratar de identificar al virus en animales enfermos o moribundos. En este estudio todos los animales manifestaron signos de enfermedad y fue la muestra ideal con el fin de determinar la presencia del virus debido a que en truchas arco iris aparentemente sanas, la probabilidad de detectar una infección por EHNv es extremadamente baja, a pesar de que la enfermedad este activa en la misma población, porque la prevalencia de la infección es generalmente baja y hay una alta tasa de mortalidad. El EHNv solo se puede detectar en peces que están clínicamente afectados o que han muerto por la infección. No se considera un buen estudio el muestreo aleatorio incluso durante un brote de la enfermedad porque la prevalencia de la infección es generalmente muy baja. Por tanto se recomienda el examen de las mortalidades normales en una piscigranja (Whittington *et al.*, 1999).

Se ha determinado que, durante los brotes, el EHNv se ha detectado mediante aislamiento del virus en un 60-80% de los peces moribundos o muertos, pero en solo un 0-4% de los peces clínicamente sanos expuestos al virus. Con límites de confianza del 99%, la prevalencia de la infección subclínica es del 0-8% (Whittington et al., 1994; 1999), así el virus podría no hallarse en absoluto en cohortes supervivientes tras un brote. Se detectaron anticuerpos anti EHNv en peces de piscifactoría a una baja prevalencia (0,7%, del 0,02% al 3,7% con límites de confianza del 95%), por lo que utilizando una prueba con alta sensibilidad y especificidad como el PCR nos dan una mayor confiabilidad de poder detectar el virus en este estudio.

El manual de pruebas diagnósticas de la OIE afirma que “Durante un brote de baja intensidad en la trucha arco iris, la prevalencia del EHNv entre las mortalidades puede ser del 60-80% y la contribución del EHNv a la mortalidad de “fondo” es suficiente para permitir la detección del virus en ausencia de enfermedad manifiesta en la población. Para la detección del EHNv y a efectos de la certificación, la población de interés es “la población de mortalidad” y se pueden calcular los números de muestras necesarias para detectar al menos un individuo infectado por el EHNv a un determinado nivel de confianza teniendo en cuenta el nivel de prevalencia de la infección y la sensibilidad de la prueba (Cannon y Roe, 1982; Simon y Schill, 1984). Durante un brote del virus se detectó en al menos el 2% de los peces muertos (Whittington et al., 1999). Por este motivo se asume una prevalencia del 2% para el muestreo del EHNv a efectos de certificación”. Teniendo una sensibilidad y especificidad del 99%.por la prueba de PCR realizadas en este estudio y por el tipo de muestra de animales enfermos, se puede estimar que las áreas muestreadas están libres del virus, sin embargo esta afirmación debe ser confirmada con un estudio continuo de todos los animales que mueren dentro de los patrones de “normalidad” en las piscigranjas. Esta normalidad de mortalidad debe ser establecida en cada una de las piscigranjas por las condiciones de manejo sanitario que cada una de ellas tengan.

En el estudio los animales estuvieron enfermos por infecciones principalmente bacterianas ya que se detectó microbiológicamente la presencia de las bacterias *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas spp* de las muestras de bazo e hígado y en algunos riñones de los animales analizados. Estas bacterias son las más prevalentes en las piscigranjas del país.

Los cebadores MC1 utilizados en este estudio son los propuestos por la OIE para detectar el genoma viral en forma específica al género *Ranavirus* sin diferenciarlas entre sus especies. Para realizar la diferenciación se debe emplear el método de enzimas de restricción también propuesto en el manual de la OIE (OIE, 2012). Al salir todos negativos, no se pudo realizar el método de diferenciación de las especies virales. Sin embargo, la presencia de algunas bandas inespecíficas de poco tamaño requirió el aumento de la temperatura de hibridación a 60 o 62°C para reducir la amplificación inespecífica ya que se utilizaron tejidos de peces y son una de las recomendaciones en el desarrollo de la prueba de PCR por el manual de pruebas de diagnóstico de la OIE (OIE, 2012). Para confirmar la negatividad de las muestras se usó del kit comercial” Vet PCR EHNv Detection Kit” de Bioingetech el cual tiene controles internos de la prueba además de los controles positivos y negativos; además no se evidenciaron bandas inespecíficas. La diferencia de estas dos pruebas moleculares se debe a las diferencias de los cebadores que amplifican regiones diferentes del genoma viral.

CONCLUSIONES

- No se demostró la presencia de material genómico para la secuencia MCP de las especies pertenecientes a la familia Iridoviridae, ni la presencia de EHNv en las muestras trabajadas con el kit de detección VetPCRTM EHNv.
- Las especies de la familia Iridoviridae no se encuentran presentes o en menor al 5% en los sistemas de crianza de truchas semi-tecnificados evaluados en el presente estudio.
- Alternativas para una certeza diagnóstica incluirían el uso de enzimas de restricción a partir de productos primarios de un ensayo de PCR o el uso de un ensayo de PCR en tiempo real que permitiría la detección y cuantificación del virus de EHNv.
- Debe tomarse en cuenta estos resultados para fortalecer el diagnóstico en otras piscigranjas del país.

LITERATURA CITADA

1. **Ahne W, Bearzotti M, Bremont M, Essbauer S. 1998.** Comparison of European systemic piscine and amphibian Iridoviruses with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus and Frog Virus-3. *J Vet Med* 45: 373-383.
2. **Australian Government Department of Agriculture (AGDA). 2014.** Fisheries and Forestry. “Aquatic Animal Diseases Significant to Australia: Identification Field Guide 4th Edition.” Accessed May 22. <http://www.daff.gov.au/animal-plant-health/pests-diseases-weeds/aquatic-animal-diseases-significant-to-australia-identification-field-guide-4th-edition>.
3. **Becker JA, Tweedie A, Gilligan D, Asmus M, Whittington RJ, 2013.** Experimental Infection of Australian freshwater fish with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J Aquat Animal Health* 25(1): 66-76.
4. **Bengtén E, Wilson M, Miller N, Clem LW, Pilström L, and Warr GW. 2000.** “Immunoglobulin Isotypes: Structure, Function, and Genetics.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 248: 189–219.
5. **Chinchar VG, Yu KH, and Jancovich JK. 2011.** “The Molecular Biology of Frog Virus 3 and Other Iridoviruses Infecting Cold-Blooded Vertebrates.” *Viruses* 3 (10): 1959–85.
6. **Chinchar VG and Hyatt A. 2009.** “Family Iridoviridae: Poor Viral Relations No Longer.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328: 123–70.
7. **Chinchar VG, Wang J. 2001.** “Inactivation of Frog Virus 3 and Channel Catfish Virus by Esculentin-2P and Ranatuerin-2P, Two Antimicrobial Peptides Isolated from Frog Skin.” *Virology*, no. 2: 351–57.
8. **Chinchar VG and Yu W. 1990.** “Frog Virus 3-mediated Translational Shut-off: Frog Virus 3 Messages Are Translationally More Efficient Than Host and Heterologous Viral Messages Under Conditions of Increased Translational Stress.” *Virus Research* 16 (2): 163–74.

9. **Chinchar GV and Dholakia JN. 1989.** “Frog Virus 3-induced Translational Shut-off: Activation of an eIF-2 Kinase in Virus-infected Cells.” *Virus Research* 14 (3): 207–23.
10. **Cinkova K, Reschova S, Kulich P, Vesely T. 2010.** Evaluation of polyclonal antibody for the detection and identification of Ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis Aquat Org* 89: 191-198.
11. **Crane M and Hyatt A. 2011.** “Viruses of Fish: An Overview of Significant Pathogens.” *Viruses* 3 (11): 2025–46.
12. **Du Pasquier L, Schwager J, and Flajnik MF. 1989.** “The Immune System of *Xenopus*.” *Annual Review of Immunology* 7: 251–75.
13. **Eaton HE, Metcalf J, Penny E, Tcherepanov V, Upton C, and Brunetti CR. 2007.** “Comparative Genomic Analysis of the Family Iridoviridae: Re-annotating and Defining the Core Set of Iridovirus Genes.” *Virology Journal* 4 (1): 11.
14. **FAO. 2011.** Base de Datos de Pesca y Acuicultura de la FAO. Fishtat Plus.
15. **FAO. 2009.** Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponible en:
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
16. **FAO 2006-2015.** Aquaculture topics and activities. Acuicultura. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 14 September 2015. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>
17. **Goorha R. 1982.** “Frog Virus 3 DNA Replication Occurs in Two Stages.” *Journal of Virology* 43 (2): 519–28.
18. **Goorha R, Willis DB and Granoff A. 1979.** “Macromolecular Synthesis in Cells Infected by Frog Virus 3 XII. Viral Regulatory Proteins in Transcriptional and Post-Transcriptional Controls.” *Journal of Virology* 32 (2): 442–48.

19. **Hanson LA, Petrie-Hanson L, Meals K, Chinchar G, and Rudis M. 2001.** “Persistence of Largemouth Bass Virus Infection in a Northern Mississippi Reservoir after a Die-Off.” *Journal of Aquatic Animal Health* 13 (1): 27–34.
20. **Hendrick RP, McDowell TS, Ahne W, Torhy C, De Kinkelin P. 1992.** Properties of three Iridovirus - like agents associated with systemic infections of fish. *Dis Aquat Org* 13:203-209.
21. **Hogan RJ, Waldbieser GC, Goudie CA, Antao A, Godwin UB, Wilson MR, Miller NW, et al. 1999.** “Molecular and Immunologic Characterization of Gynogenetic Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*).” *Marine Biotechnology* 1 (4): 317–27.
22. **Holopainen R. 2012.** “Ranaviruses: Detection, Differentiation and Host Immune”. Academic Dissertation. University of Helsinki - Faculty of Veterinary Medicine. Accessed May 17. <https://www.yumpu.com/en/document/view/3837857/ranaviruses-detection-differentiation-and-host-immune-helda>.
23. **Kelly DC. 1985.** “Insect Iridescent Viruses.” In *Iridoviridae*, edited by Dr Dawn B. Willis, 23–35. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 116. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70280-8_2.
24. **Langdon JS, Humphrey JD, and Williams LM. 1988.** “Outbreaks of an EHNv-like Iridovirus in Cultured Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri* Richardson, in Australia.” *Journal of Fish Diseases* 11 (1): 93–96.
25. **Lesbarreres D, Balseiro A, Brunner J, Chinchar VG, Duffus A, Kerby J, Miller DL, et al. 2012.** “Ranavirus: Past, Present and Future.” *Biology Letters* 8 (4): 481–83.
26. **Long S, Wilson M, Bengtén E, Clem LW, Miller NW, and Chinchar VG. 2004.** “Identification and Characterization of a FasL-like Protein and cDNAs encoding the Channel Catfish Death-inducing Signaling Complex.” *Immunogenetics* 56 (7): 518–30.
27. **MacLachlan NJ and Dubovi EJ. 2010.** *Fenner’s Veterinary Virology*. Academic Press.

28. **Mendoza, D. 2011.** Informe: Panorama de la Acuicultura Mundial, en América Latina y el Caribe y en el Perú, Dirección General de Acuicultura, Ministerio de la Producción. Lima, Perú. 66p.
29. **[OIE]. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2012.** “Manual of Diagnostic Test For Aquatic Animals.” Accessed May 17. <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>.
30. **Ostrander GK. 2000.** The Laboratory Fish. Elsevier.
31. **Peeler EJ, Afonso A, Berthe FC, Brun E, Rodgers CJ, Roque A, Whittington RJ, and Thrush MA. 2009.** “Epizootic Haematopoietic Necrosis virus—An Assessment of the Likelihood of Introduction and Establishment in England and Wales.” Preventive Veterinary Medicine 91 (2–4): 241–53
32. **Plumb JA and Hanson LA. 2011.** Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. John Wiley & Sons.
33. **Reddacliff LA and Whittington RJ. 1996.** “Pathology of Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) and Redfin Perch (*Perca Fluviatilis* L).” Journal of Comparative Pathology 115 (2): 103–15.
34. **Roberts RJ, and Shepherd CJ. 1980.** Enfermedades de la trucha y del salmón. Editorial Acribia - España.
35. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2013.** Resolución 375-2013-SENASA. Argentina. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-3752013>
36. **Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Volatier C, and Terech-Majewska E. 1999.** “Effects of Iridovirus-like Agent on the Cell-mediated Immunity in Sheatfish (*Silurus Glanis*)--an in Vitro Study.” Virus Research 63 (1-2): 115–19.

37. **Siwicki A, Pozet F, Morand M, Terech-Majewska E, and Bernard D. 2001.** “Pathogenesis of Iridovirus: In Vitro Influence on Macrophage Activity and Cytokine-Like Protein Production in Fish.” *Acta Veterinaria Brno* 70 (4): 451–56.
38. **Smith GR, Stearley RF. 1989.** The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trout. *Fisheries* 1:4-10.
39. **Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, Kearns C, Zupanovic Z, and Callinan RB. 1999.** “Further Observations on the Epidemiology and Spread of Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) in Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* in Southeastern Australia and a Recommended Sampling Strategy for Surveillance.” *Diseases of Aquatic Organisms* 35 (2): 125–30.
40. **Whittington RJ, and Reddacliff GL. 1995.** “Influence of Environmental Temperature on Experimental Infection of Redfin Perch (*Perca fluviatilis*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus, an Australian Iridovirus.” *Australian Veterinary Journal* 72 (11): 421–24.
41. **Whittington RJ, Philbey A, Reddacliff GL, and Macgown AR. 1994.** “Epidemiology of Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) Infection in Farmed Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum): Findings Based on Virus Isolation, Antigen Capture ELISA and Serology.” *Journal of Fish Diseases* 17 (3): 205–18.
42. **Williams T, Barbosa Solomieu V, and Chinchar VG. 2005.** “A Decade of Advances in Iridovirus Research.” In *Advances in Virus Research*, 65:173–248. Elsevier. <http://europepmc.org/abstract/MED/16387197>.
43. **Willis DB, and Granoff A. 1980.** “Frog Virus 3 DNA Is Heavily Methylated at CpG Sequences.” *Virology* 107 (1): 250–57.
44. **Yoder JA. 2004.** “Investigating the Morphology, Function and Genetics of Cytotoxic Cells in Bony Fish.” *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 138 (3): 271–80.

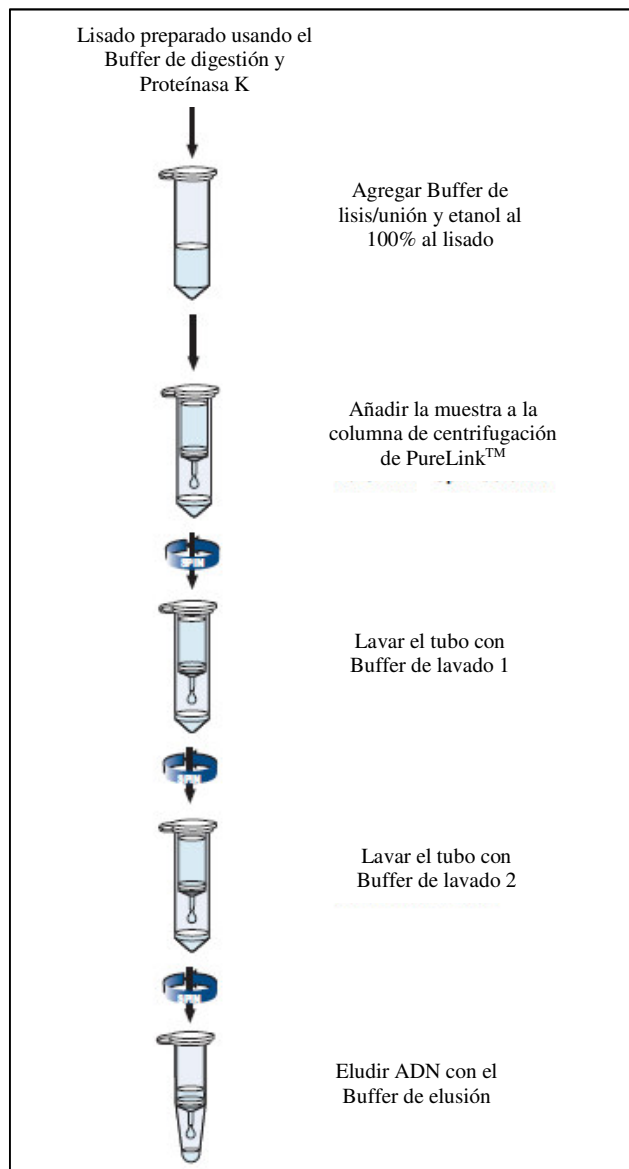
APÉNDICE 1

Protocolo PureLink® Genomic DNA Kits para la Purificación Genómica de ADN

PASO	PROCEDIMIENTO
Preparando el lisado	<p>Preparar el lisado utilizando un protocolo de preparación apropiada de la muestra de la siguiente manera:</p> <ol style="list-style-type: none"> Colocar 200µL de muestra en un tubo de microcentrífuga esteril y añadir 180 µl PureLink® Genómica digestión Buffer y 20 µl de proteínasa K (suministrado con el kit) al tubo. Asegúrese de que el tejido está completamente inmerso en la mezcla tampón. Nota: Al procesar múltiples muestras, preparar un <i>master</i> digestión Buffer Mezclar mediante la mezcla de 180 µl Buffer de digestión y 20 µl de proteínasa K para cada muestra. Incubar a 55 ° C con vórtex ocasional hasta que la lisis esté completa (1-4 horas). Para eliminar cualquier material residual, centrifugar el lisado a la máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un nuevo y estéril tubo de microcentrífuga. Añadir 20 µl ARNasa (suministrado en el kit) al lisado, mezclar bien por breve agitación en vórtex, y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Añadir 200 µl Buffer PureLink® Genómica Lisis/unión y mezclar bien por vórtex. Añadir 200 µl 96-100% de etanol al lisado. Mezclar bien por agitación durante 5 segundos. Nota: Al procesar múltiples muestras, preparar un maestro Buffer / etanol Mix mezclando 200 µl de Buffer lisis/unión y 200 µl de etanol al 100% por muestra. Proceda inmediatamente a la unión al ADN
Unión de ADN	<ol style="list-style-type: none"> Retire una columna de centrifugación PureLink® en un tubo de colección del paquete. Cargar el lisado (~ 640 µl) con el Buffer de lisis/unión y etanol al 100%. Centrifugar la columna a 10.000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Deseche el tubo de colección y coloque la columna de centrifugación en un nuevo tubo de colección. Continúe con la sustancia de lavado de ADN.
Lavado de ADN	<ol style="list-style-type: none"> Lavar la columna con 500 µL de Buffer de lavado 1 preparado con etanol. Centrifugar la columna a 10.000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Deseche el tubo de colección y coloque la columna de centrifugación en un nuevo tubo de colección. Lavar la columna con 500 µL de Buffer de lavado 2 preparado con etanol. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de colección. Continúe con la elución del ADN.

Elución del ADN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. 2. Eluir el ADN con 25 a 200 μL de PureLink® Genómica Buffer de elución. 3. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto. 4. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente. <i>El tubo contiene ADN purificado.</i> 5. Si se desea, realizar una segunda elución para incrementar la recuperación, aunque en general disminuye la concentración. El tubo contiene ADN purificado. Retire y deseche la columna. 6. Utilice el gDNA purificado concentrado en el líquido de la base para la aplicación deseada. Guarde el gDNA purificado a 4°C durante corto plazo o -20 ° C para el almacenamiento a largo plazo.
-----------------	---

Ilustración del Procedimiento de Purificación del ADN usando el Mini Kit
(PureLink Genomic DNA Kit)



APÉNDICE 2

Procedimiento Técnico del PCR (OIE, 2014)

Preparación de reactivos

Los reactivos controles de PCR, ADN purificado de EHNv, y ADN purificado de BIV, se suministran en forma liofilizada por el laboratorio de referencia. Se reconstituyen con 0,5 ml de tampón TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) dejando el vial a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se mezcla el contenido muy suavemente. Para uso normal como control de PCR se recomienda que las soluciones de trabajo se preparen a una dilución 1/10 en tampón TE (pH 8,0). Se deben guardar a -20°C alícuotas de 125 µl. Cada alícuota es suficiente para 50 reacciones (se añaden a la mezcla 5 µl) y tiene una vida útil de al menos 6 meses desde la fecha de la dilución. Los cebadores M151 y M152 (MCP-1, 321 pb), M153 y M154 (MCP-2, 625 pb) se suministran a la concentración de trabajo y deben mantenerse a -20°C. Los cebadores también pueden obtenerse de suministradores comerciales. Las secuencias de los cebadores se indican en el cuadro siguiente:

Ensayo de PCR	Cebador	Secuencia	Tamaño de productos	Localización de genes
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 pb	266 - 586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 pb	842 - 1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

Mezcla para PCR

En un volumen final de 50 μ l (incluyendo los 5 μ l del ADN de muestra), las reacciones de amplificación contienen 2,5 μ l de cada uno de los cebadores de trabajo, 200 μ M de cada nucleótido dATP, dTTP, dGTP y dCTP, tampón 10 \times PCR (66,6 mM de Tris/HCl, 16,6 mM de (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM de MgCl₂, 1,65 mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 mM de beta-mercaptoetanol) y 2 U de polimerasa Taq. Se incluyen dos controles negativos, uno con solo mezcla de PCR y otro conteniendo 5 μ l de tampón TE. En el cuadro 3 se presentan instrucciones para la preparación del tampón 10 \times PCR.

Ingredientes	Cantidad	Concentración final en 50 μ L de mezcla PCR
Tris	4.050g	66.6 mM
Sulfato amónico	1.100 g	16.6 mM
BSA (Fracción V de seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos)	0.825g	1.65 mg/mL
Cloruro magnésico	1.25 mL	2.5 mM
Tampón TE (estéril)	50 mL	

Las reacciones para MCP-1 y MCP-2 tienen el siguiente perfil: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto; una extensión final a 72°C durante 5 minutos, y enfriamiento a 4°C. Los resultados de la PCR se comprueban por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El ADN control del EHNV para PCR (solución de trabajo 1/10) debería dar un resultado similar en intensidad a la banda de 10-3 en ambos casos.

APÉNDICE 3

Protocolo del Vet PCRTM EHNv Detection Kit (VET-P002-48D / VET-P002-96D)

Preparación del ADN

A partir de diferentes muestras, llevar a cabo el aislamiento de ADN según las instrucciones disponibles en el kit. Descongelar completamente los componentes del kit antes de su uso; homogenizar las soluciones por varios segundos antes de pipetear.

1. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA EHN_v PCR

- Preparar la mezcla de reacción para la muestra, el control positivo, negativo control, y el control interno mediante la combinación de los reactivos como se muestra en el cuadro siguiente, al final la reacción debería contener 13.5µL

Componente del kit	Muestra	Control Positivo	Control Negativo	Control Interno
VetPCR™ EHN _v Premixturee	5.5 µL	5.5 µL	5.5 µL	
Control Interno del PCR				5.5 µL
Agua libre de ADNasa/ARNasa	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL
ADN aislado de la muestra	2 µL			2 µL
Control Positivo EHN _v PCR		2 µL		
Control Negativo de PCR			2 µL	
Solución de Aceite Mineral	11 µL	11 µL	11 µL	11 µL

- Colocar los tubos en el termociclador y programar la secuencia de amplificación de la siguiente manera:

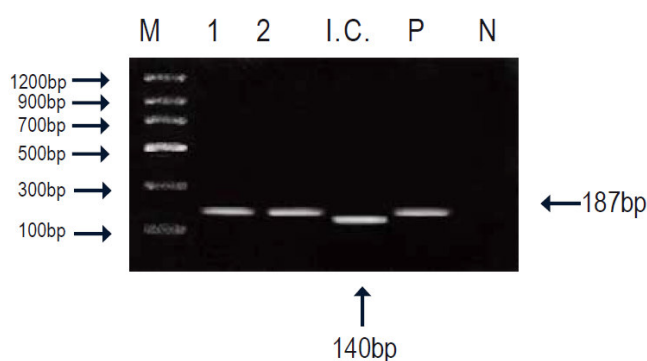
Ciclo PCR		Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Inicio de la Desnaturalización	94°C	2 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 segundos
	Alineación	57°C	30 segundos
	Extensión	72°C	30 segundos
1 ciclo	Extensión Final	72°C	5 minutos

2. DETECCIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

- Preparar un 1,5% en gel de agarosa que contiene bromuro de etidio (Et-Br).
- Cargar 7µl de producto de PCR, 7µl de control positivo, 7µl de control negativo, 7µl de control interno y 2µl del marcador de Peso Molecular Brig TM en gel de agarosa sin la adición de un colorante.
- Ejecutar electroforesis por 100V (requerido unos 30 ~ 40 minutos).
- Identificar el resultado en transiluminador ultravioleta (UV).

3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Tamaño esperado del producto de PCR: 187bp



Leyenda de la imagen:

Línea M: Marcador de peso molecular BringTM (Bioingentech Ltd)

Línea 1~2: Muestra positiva a EHNv

Línea I.C: Control Interno

Línea P: Control Positivo

Línea N: Control Negativo